

Light source for illumination in scanning microscopy, and scanning microscope

Veröffentlichungsnr. (Sek.) [US2002063220](#)

Veröffentlichungsdatum : 2002-05-30

Erfinder : ENGELHARDT JOHANN (DE); HOFFMANN JUERGEN (DE)

Anmelder : LEICA MICROSYSTEMS (US)

Veröffentlichungsnummer : [DE10056382](#)

Aktenzeichen:
(EPIDOS-INPADOC-normiert) US20010985015 20011101

Prioritätsaktenzeichen:
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE20001056382 20001114

Klassifikationssymbol (IPC) : G01N21/64

Klassifikationssymbol (EC) : G02B21/00M4A

Korrespondierende Patentschriften [GB2369953](#), JP2002196252, US6813073

Bibliographische Daten

The present invention discloses a light source for illumination in scanning microscopy, and a scanning microscope. The light source and the scanning microscope contain an electromagnetic energy source that emits light of one wavelength, and a means 5 for spatially dividing the light into at least two partial light beams. An intermediate element for wavelength modification is provided in at least one partial light beam.

Daten aus der esp@cenet Datenbank - - I2



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 100 56 382 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/00

(21) Aktenzeichen: 100 56 382.1
(22) Anmeldetag: 14. 11. 2000
(43) Offenlegungstag: 23. 5. 2002

DE 100 56 382 A 1

(71) Anmelder:
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 68165
Mannheim, DE

(72) Erfinder:
Engelhardt, Johann, Dr., 76669 Bad Schönborn, DE;
Hoffmann, Jürgen, Dr., 65191 Wiesbaden, DE

(56) Entgegenhaltungen:

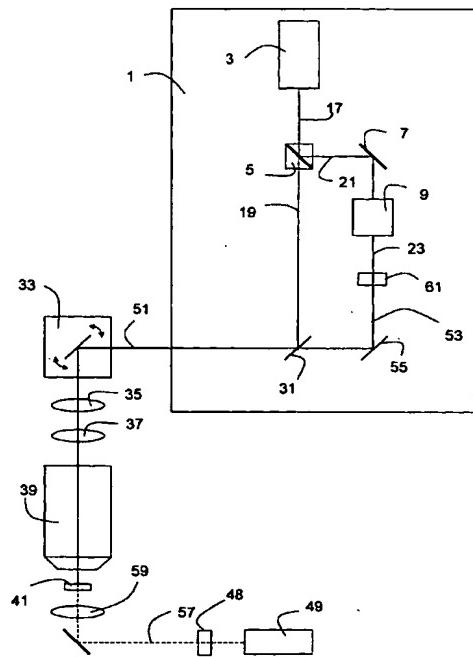
DE 44 16 558 C2
DE 195 17 753 A1
DE 44 07 664 A1
CH 6 78 108 A5

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) **Lichtquelle zur Beleuchtung in der Scanmikroskopie und Scanmikroskop**

(57) Die vorliegende Erfindung offenbart eine Lichtquelle zur Beleuchtung in der Scanmikroskopie und ein Scanmikroskop. Die Lichtquelle und das Scanmikroskop beinhalten eine elektromagnetische Energiequelle (3), die Licht (17) einer Wellenlänge emittiert und ein Mittel (5) zum räumlichen Aufteilen des Lichts in mindestens zwei Teillichtstrahlen (19, 21). In mindestens einem Teillichtstrahl (19, 21) ist ein Zwischenelement (9) zur Wellenlängenveränderung vorgesehen.



DE 100 56 382 A 1

Beschreibung

- [0001] Die Erfindung betrifft ein Lichtquelle zur Beleuchtung in der Scanmikroskopie.
- [0002] Das Scanmikroskop kann auch als konfokales Mikroskop ausgestaltet sein.
- [0003] Ferner betrifft die Erfindung ein Scanmikroskop. Im besonderen betrifft die Erfindung ein Scanmikroskop, das einen von einem Beleuchtungssystem erzeugten Lichtstrahl unter Zwischenschaltung mehrerer optischer Mittel über ein Objekt führt und mindestens einen Detektor, der über die mehreren optischen Mittel ein vom Objekt ausgehendes Licht empfängt.
- [0004] In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus des Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so daß ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.
- [0005] Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.
- [0006] Ein konfokales Rastermikroskop umfaßt im allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslight wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so daß man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.
- [0007] Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichtes wird in festen Zeitabständen während des Abtastvorganges gemessen und so Rasterpunkt für Rasterpunkt abgetastet. Der Meßwert muss eindeutig der dazugehörigen Scanposition zugeordnet werden, um aus den Meßdaten ein Bild erzeugen zu können. Zweckmäßiger Weise werden hierfür die Zustandsdaten der Verstellelemente der Strahlablenkeinrichtung laufend mitgemessen oder, was allerdings weniger genau ist, direkt die Steuersolldaten der Strahlablenkeinrichtung verwendet.
- [0008] Es ist auch möglich in einer Durchlichtanordnung beispielsweise das Fluoreszenzlicht oder die Transmission des Anregungslichtes kondensorseitig zu detektieren. Der Detektionslichtstrahl gelangt dann nicht über die Scanspiegel zum Detektor (Non-Descan-Anordnung). Für die Detektion des Fluoreszenzlichtes wäre in der Durchlichtanordnung eine kondensorseitige Detektionsblende nötig, um, wie in der beschriebenen Descan-Anordnung, eine dreidimensionale Auflösung zu erzielen. Im Falle der Zweiphotonenanregung kann jedoch auf eine kondensorseitige Detektions-
- blende verzichtet werden, da die Anregungswahrscheinlichkeit vom Quadrat der Photonendichte abhängt (Proportional Intensität²), die naturgemäß im Fokus viel höher ist als in den Nachbarregionen. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht stammt daher mit großer Wahrscheinlichkeit zum aller größten Teil aus der Fokusregion, was eine weitere Differenzierung von Fluoreszenzphotonen aus dem Fokusbereich von Fluoreszenzphotonen aus den Nachbarbereichen mit einer Blendenanordnung überflüssig macht.
- [0009] Das Auflösungsvermögen eines konfokalen Rastermikroskops ist unter anderem durch die Intensitätsverteilung und die räumliche Ausdehnung des Fokus des Beleuchtungslichtstrahles gegeben. Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für Fluoreszenzanwendungen ist aus der PCT/DE/95100124 bekannt. Hierbei werden die lateralen Randbereiche des Beleuchtungsfokusvolumens mit Laserlicht einer anderen Wellenlänge, das von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert wird dann nur das spontan emittierte Licht aus den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so daß insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.
- [0010] Im Bereich der STED-Mikroskopie werden üblicherweise zwei Laser eingesetzt, nämlich einer zum Anregen eines Probenbereichs und ein weiterer zur Erzeugung der stimulierten Emission. Insbesondere zur Erzeugung der stimulierten Emission sind hohe Lichtleistungen und gleichzeitig eine möglichst flexible Wellenlängenauswahl erforderlich. Hierzu werden oft Optisch parametrische Oszillatoren (OPO) eingesetzt. OPOs sind sehr teuer und OPOs benötigen darüber hinaus leistungsstarke Pumpulaser. Diese sind meist modenverkoppelte Pulslaser die auch sehr teuer sind. Hinzu kommen die Kosten für die Anregungslichtquelle. Alle Laser müssen ferner exakt justiert werden, um die einzelnen Probenbereiche exakt zu treffen. Im Falle der gepulsten Anregung muß darauf geachtet werden, daß die die stimulierte Emission erzeugenden Lichtpulse innerhalb eines bestimmten Zeitraumes, der von der Lebensdauer der ange regten Zustände des Probenmaterials abhängt, nach den Anregungslichtpulsen eintreffen. Eine Synchronisation der Pulslaser aufeinander ist aufwendig und funktioniert oft unbefriedigend und instabil.
- [0011] Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Lichtquelle und ein Scanmikroskop vorzuschlagen, die die aufgezeigten Probleme lösen.
- [0012] Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Lichtquelle zur Beleuchtung in der Scanmikroskopie gelöst, die dadurch gekennzeichnet ist, dass eine elektromagnetische Energiequelle vorgesehen ist, die Licht einer Wellenlänge emittiert und dass der elektromagnetischen Energiequelle ein Mittel zum räumlichen Aufteilen des Lichts in mindestens zwei Teillichtstrahlen nachgeschaltet ist und dass in mindestens einem Teillichtstrahl ein Zwischenelement zur Wellenlängenveränderung vorgesehen ist.
- [0013] Hinsichtlich eines Scanmikroskops wird die Aufgabe durch ein Scanmikroskop mit einer Strahlablenkeinrichtung zur Führung eines Beleuchtungslichtstrahles über eine Probe, einer Mikroskopoptik und einem Detektor, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine elektromagnetische Energiequelle vorgesehen ist, die Licht einer Wellenlänge emittiert und dass der elektromagnetischen Energiequelle ein Mittel zum räumlichen Aufteilen des Lichts in mindestens zwei Teillichtstrahlen nachgeschaltet ist und dass in mindestens einem Teillichtstrahl ein Zwischenelement zur Wellenlängenveränderung vorgesehen ist.

[0014] Durch den Einsatz der erfundungsgemäßen Lichtquelle wird die Beleuchtung in der Mikroskopie und insbesondere in der STED-Mikroskopie sehr vereinfacht und verbilligt, da nur eine elektromagnetische Energiequelle benötigt wird. In einer besonderen Ausgestaltung dient ein Teillichtstrahl zur optischen Anregung eines ersten Bereichs einer Probe. Ein weiterer Teillichtstrahl, dessen Wellenlänge mit Hilfe eines Zwischenelementes verändert wird, wird zur Erzeugung der stimulierten Emission in einem weiteren Bereich der Probe verwendet. Hierbei überlappen der erste und der weitere Bereich zumindest teilweise. Die Wellenlänge des zweiten Teillichtstrahls wird mit einem Zwischenelement verändert. Dieses Zwischenelement ist vorzugsweise ein Optisch-Parametrischer-Oszillatator (OPO).

[0015] Die Erfindung hat den weiteren Vorteil, daß im Falle der gepulsten Anregung, beispielsweise zum Zwecke der Mehrphotonenanregung, auf eine Synchronisation von Pulslichtquellen zueinander verzichtet werden kann, wenn die elektromagnetische Energiequelle, von der sowohl die Anregung, als auch die stimulierte Emission verursacht wird, ein Pulslaser ist.

[0016] In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

[0017] Fig. 1 eine erfundungsgemäße Lichtquelle,

[0018] Fig. 2 eine erfundungsgemäße Scannmikroskop mit erhöhter Auflösung durch STED in Descanordnung,

[0019] Fig. 3 eine erfundungsgemäße Scanmikroskop mit erhöhter Auflösung durch STED in Non- Descanordnung und Mehrphotonenanregung,

[0020] Fig. 4a eine schematische Darstellung der sich einer Probe überlappenden Teillichtstrahlen, und

[0021] Fig. 4b eine weitere schematische Darstellung der sich einer Probe überlappenden Teillichtstrahlen.

[0022] Fig. 1 zeigt eine erfundungsgemäße Lichtquelle 1. Als elektromagnetische Energiequelle 3 ist ein Pulslaser vorgesehen, der als Titan:Saphir-Laser ausgeführt ist. Das Licht 17 des Pulslasers wird mit dem Mittel zum räumlichen Aufteilen des Lichts, das als Strahlteiler 5 ausgeführt ist, in einen ersten und zweiten Teillichtstrahl 19 und 21 aufgespalten. Der Teillichtstrahl 21 gelangt über den Spiegel 7 zum Zwischenelement 9, das als optisch parametrischen Oszillatator ausgeführt ist. Der vom optisch parametrischen Oszillatator 9 ausgehende Teillichtstrahl 23 wird über den Spiegel 11 zum dichroitischen Strahlvereiniger 13 geführt, um dort mit dem ersten Teillichtstrahl 19 zum Beleuchtungslicht 15 vereinigt zu werden, das aus der Lichtquelle 1 austritt. Die Spiegel 7 und 11 sind verkippbar gelagert, so daß die relative Lage der Komponenten des Beleuchtungslichtes zueinander eingestellt werden.

[0023] Fig. 2 zeigt ein erfundungsgemäßes Scanmikroskop, das als konfokales Scanmikroskop ausgeführt ist. In der hier gezeigten Ausführung beinhaltet die Lichtquelle 1 im Strahlengang des Teillichtstrahles 23 neben einem optisch parametrischen Oszillatator 9 ein Mittel zur Beeinflussung der Fokusform, das als $\lambda/2$ -Platte ausgeführt ist und nur vom mittleren Teil des Querschnitts des Teillichtstrahles 23 durchstrahlt wird. Auch der Teillichtstrahl 19 gelangt zu einem optisch parametrischen Oszillatator 25. Der von dort ausgehende Teillichtstrahl weist eine andere Wellenlänge auf und ist mit 27 bezeichnet.

[0024] Der Teillichtstrahl 23, der die $\lambda/2$ -Platte passiert hat, wird zum dichroitischen Strahlvereiniger 13 geführt, um dort mit dem Teillichtstrahl 27 zum Beleuchtungslicht 29 vereinigt zu werden, das aus der Lichtquelle 1 austritt.

[0025] Der Beleuchtungslicht 29 wird von einem Strahlvereiniger 31 zur Strahlablenkeinrichtung 33 reflektiert, das einen kardanisch aufgehängten Scanspiegel 32 beinhaltet,

der das Beleuchtungslicht 29 durch die Scanoptik 35, die Optik 37 und durch die Mikroskopoptik 39 hindurch über bzw. durch die Probe 41 führt. Das Beleuchtungslicht 29 wird bei nicht transparenten Proben 41 über die Probenoberfläche geführt. Bei biologischen Proben 41 (Präparaten) oder transparenten Proben kann das Beleuchtungslicht 29 auch durch die Probe 41 geführt werden. Dies bedeutet, dass aus verschiedenen Fokusebenen der Probe 41 nacheinander durch Beleuchtungslicht 29 abgetastet werden. Das Beleuchtungslicht 29 ist als durchgezogene Linie dargestellt.

[0026] Das von der Probe ausgehende Detektionslicht 43 gelangt durch die Mikroskopoptik 39 und über das Scanmodul 33 zum Strahlteiler 31, passiert diesen und trifft auf Detektor 47, der als Photomultiplier ausgeführt ist. Das von der Probe 41 ausgehende Detektionslicht 43 ist als gestrichelte Linie dargestellt. Im Detektor 47 werden elektrische, zur Leistung des vom Objekt ausgehenden Detektionslichtes 43 proportionale Detektionssignale erzeugt und an eine nicht gezeigte Verarbeitungseinheit weitergegeben. Vor dem Detektor ist ein Bandpassfilter 48 angeordnet, der Licht der Wellenlänge der Teillichtstrahlen 23 und 27 ausblendet. Das bei einem konfokalen Scannmikroskop üblicherweise vorgesehene Beleuchtungspinhole 46 und das Detektionspinhole 45 sind der Vollständigkeit halber schematisch eingezeichnet. Wegelassen sind wegen der besseren Anschaulichkeit hingegen einige optische Elemente zur Führung und Formung der Lichtstrahlen. Diese sind einem auf diesem Gebiet tätigen Fachmann hinlänglich bekannt.

[0027] Fig. 3 zeigt ein erfundungsgemäßes Scanmikroskop in Non-Descan-Anordnung und Mehrphotonenanregung. Zur Beleuchtung dient im Wesentlichen die in Fig. 1 gezeigte Lichtquelle 1, die zusätzlich noch ein Mittel zur Beeinflussung der Fokusform, das als $\lambda/2$ -Platte 61 ausgeführt ist und nur vom mittleren Teil des Querschnitts des Teillichtstrahles 53 durchstrahlt wird, beinhaltet. Der Teillichtstrahl 53, der die $\lambda/2$ -Platte 61 passiert hat, wird über den Spiegel 55 zum dichroitischen Strahlvereiniger 31 reflektiert, um dort mit dem Teillichtstrahl 19 zum Beleuchtungslicht 51 vereinigt zu werden, das aus der Lichtquelle 1 austritt. Die Beleuchtung der Probe 41 findet analog zu der in Fig. 2 beschriebenen Anordnung statt. Eine Anregung eines Bereichs der Probe 41 wird mit der Komponente des Beleuchtungslichtes 51 bewirkt, die die Wellenlänge des Teillichtstrahles 19 ausweist. Die stimulierte Emission wird mit der Komponente des Beleuchtungslichtes 51 erzeugt, die die Wellenlänge des Teillichtstrahles 23 hat. Durch die $\lambda/2$ -Platte 61 weist diese Komponente des Beleuchtungslichtes 51 einen innen hohlen Fokus auf, was eine Beschneidung des Emissionsvolumens in allen Raumrichtungen und somit eine Auflösungssteigerung in axialer und lateraler Richtung zur Folge hat.

[0028] Fig. 4a verdeutlicht die räumliche Lage des ersten und des zweiten Teillichtstrahls 19 und 23 innerhalb oder an der Oberfläche der zu untersuchenden Probe 41. Der zweite Teillichtstrahl 23 besitzt einen größeren Strahldurchmesser als der erste Teillichtstrahl 19, so dass der erste Teillichtstrahl 19 von zweiten Teillichtstrahl 23 im Fokusbereich vollständig umschlossen ist. Der zweite Teillichtstrahl 23 weist einen innen hohlen Fokus auf. Durch die Überlappung des ersten und des zweiten Teillichtstrahls 19 und 23 wird im Fokusbereich ein 3-dimensionaler Überlappungsbereich 63 definiert, der in Fig. 4a als schraffierte Fläche dargestellt

ist. Der Bereich der im Fokusbereich des ersten Teillichtstrahls **19** und innerhalb des hohlen Anteils des zweiten Teillichtstrahls **23** liegt, definiert das Emissionsvolumen **65**.

[0029] Fig. 4b verdeutlicht ebenfalls die räumliche Lage des ersten und des zweiten Teillichtstrahls **19** und **23** innerhalb oder an der Oberfläche der zu untersuchenden Probe **41**. Der zweite Teillichtstrahl **23** und der erste Teillichtstrahl **19** überschneiden sich jeweils im Randbereich. Durch die Überlappung im Randbereich des ersten und des zweiten Teillichtstrahls **19** und **23** wird im Fokusbereich ein 3-dimensionaler Überlappungsbereich **63** definiert, der in Fig. 4b als schraffierte Fläche dargestellt ist.

[0030] Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste

- 1** Lichtquelle
- 3** Elektromagnetische Energiequelle
- 5** Strahlteiler
- 7** Spiegel
- 9** Zwischenelement
- 11** Spiegel
- 13** Strahlvereiniger
- 15** Beleuchtungslicht
- 17** Licht
- 19** erster Teillichtstrahl
- 21** zweiter Teillichtstrahl
- 23** Teillichtstrahl
- 25** optisch parametrischer Oszillator (OPO)
- 27** Teillichtstrahl
- 29** Beleuchtungslicht
- 31** Strahlvereiniger
- 32** Scanspiegel
- 33** Strahlablenkeinrichtung
- 35** Scanoptik
- 37** Optik
- 39** Mikroskopoptik
- 41** Probe
- 43** Detektionslicht
- 45** Detektionspinhole
- 46** Beleuchtungspinhole
- 47** Detektor
- 48** Bandpassfilter
- 49** Detektor
- 51** Beleuchtungslicht
- 53** Teillichtstrahl
- 55** Spiegel
- 57** Detektionslicht
- 59** Kondensor
- 61** $\lambda/2$ -Platte
- 62** erster Bereich
- 63** Überlappungsbereich
- 65** Emissionsvolumen

Patentansprüche

1. Lichtquelle (**1**) zur Beleuchtung in der Scanmikroskopie, dadurch gekennzeichnet, dass eine elektromagnetische Energiequelle (**3**) vorgesehen ist, die Licht (**17**) einer Wellenlänge emittiert, dass der elektromagnetischen Energiequelle ein Mittel (**5**) zum räumlichen Aufteilen des Lichts in mindestens zwei Teillichtstrahlen (**19**, **21**) nachgeschaltet ist und dass in minde-

- stens einem Teillichtstrahl (**21**) ein Zwischenelement (**9**) zur Wellenlängenveränderung vorgesehen ist.
- 2. Lichtquelle (**1**) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Teillichtstrahl (**19**) direkt auf eine Probe (**41**) gerichtet ist und dort einen ersten Bereich (**62**) optisch anregt.
- 3. Lichtquelle (**1**) nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein weiterer Teillichtstrahl (**21**) über mindestens ein Zwischenelement (**9**) auf einen zweiten Bereich der Probe (**41**) derart gerichtet ist, daß dort ein Überlappungsbereich (**63**) ausgebildet ist.
- 4. Lichtquelle (**1**) nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Überlappungsbereich (**63**) stimulierte Emission erzeugbar ist.
- 5. Lichtquelle (**1**) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Zwischenelement (**9**) ein optisch parametrischer Oszillator ist.
- 6. Lichtquelle (**1**) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Zwischenelement (**9**) ein Element zur Frequenzvervielfachung ist.
- 7. Lichtquelle (**1**) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass dem Zwischenelement (**9**) ein Element zur Strahlformung nachgeschaltet ist.
- 8. Lichtquelle (**1**) nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregung eine Mehrphotonenanregung ist.
- 9. Lichtquelle (**1**) nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die elektromagnetische Energiequelle (**3**) ein Laser ist.
- 10. Lichtquelle (**1**) nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die elektromagnetische Energiequelle (**3**) ein Pulsar ist.
- 11. Scanmikroskop mit einer Strahlablenkeinrichtung (**33**) zur Führung eines Beleuchtungslichtstrahles (**29**, **51**) über eine Probe, einer Mikroskopoptik (**39**) und einem Detektor (**47**, **49**), dadurch gekennzeichnet, dass eine elektromagnetische Energiequelle (**3**) vorgesehen ist, die Licht (**17**) einer Wellenlänge emittiert und dass der elektromagnetischen Energiequelle (**3**) ein Mittel zum räumlichen Aufteilen des Lichts in mindestens zwei Teillichtstrahlen (**19**, **21**) nachgeschaltet ist und dass in mindestens einem Teillichtstrahl ein Zwischenelement (**9**, **25**) zur Wellenlängenveränderung vorgesehen ist.
- 12. Scanmikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Teillichtstrahl (**19**, **21**, **23**, **27**, **53**) direkt auf eine Probe (**41**) gerichtet ist und dort einen ersten Bereich (**62**) optisch anregt.
- 13. Scanmikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein weiterer Teilstrahl (**19**, **21**, **23**, **27**, **53**) über mindestens ein Zwischenelement (**9**, **25**) auf einen zweiten Bereich der Probe derart gerichtet ist, daß dort ein Überlappungsbereich **63** ausgebildet ist.
- 14. Scanmikroskop nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass im Überlappungsbereich (**63**) stimulierte Emission erzeugbar ist.
- 15. Scanmikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Zwischenelement (**9**, **25**) ein optisch parametrischer Oszillator ist.
- 16. Scanmikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Zwischenelement (**9**, **25**) ein Element zur Frequenzvervielfachung ist.
- 17. Scanmikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass dem Zwischenelement (**9**, **25**) ein Element zur Strahlformung nachgeschaltet ist.
- 18. Scanmikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregung eine Mehrphotonen-

anregung ist.

19. Scannmikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die elektromagnetische Energiequelle (3) ein Laser ist.
20. Scannmikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die elektromagnetische Energiequelle (3) ein Pulslaser ist. 5

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

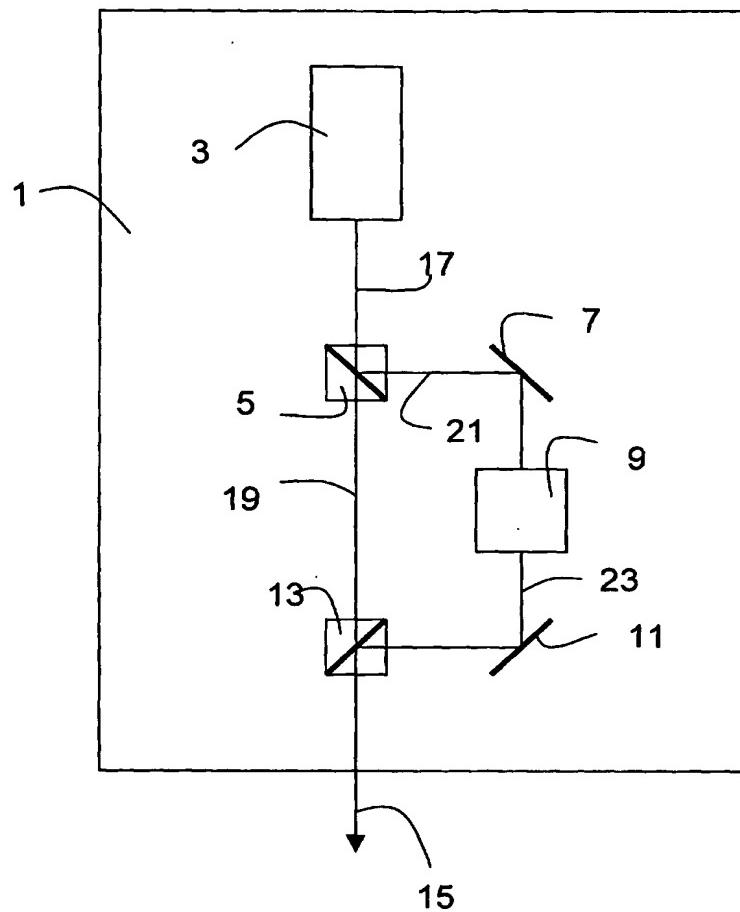


Fig. 1

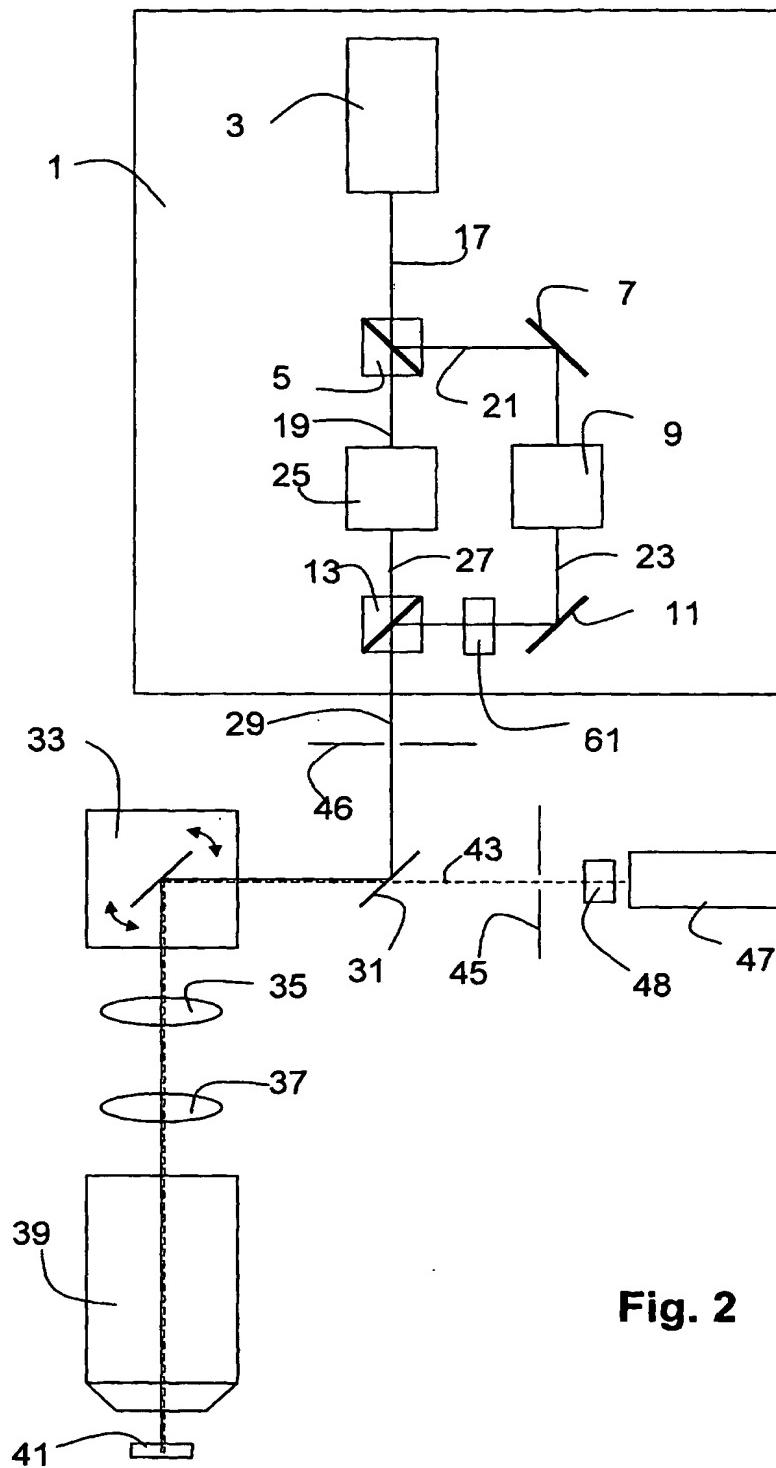


Fig. 2

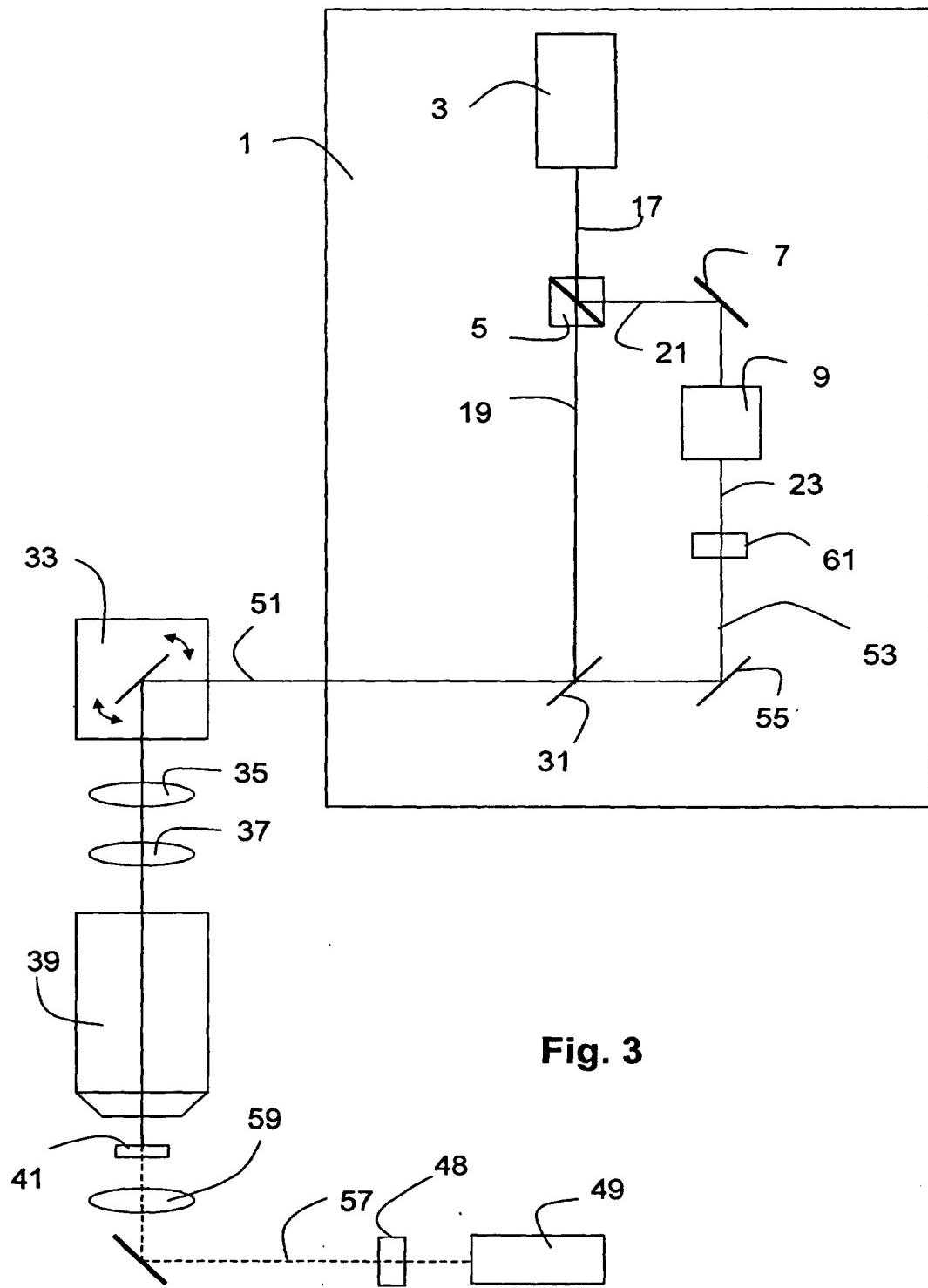
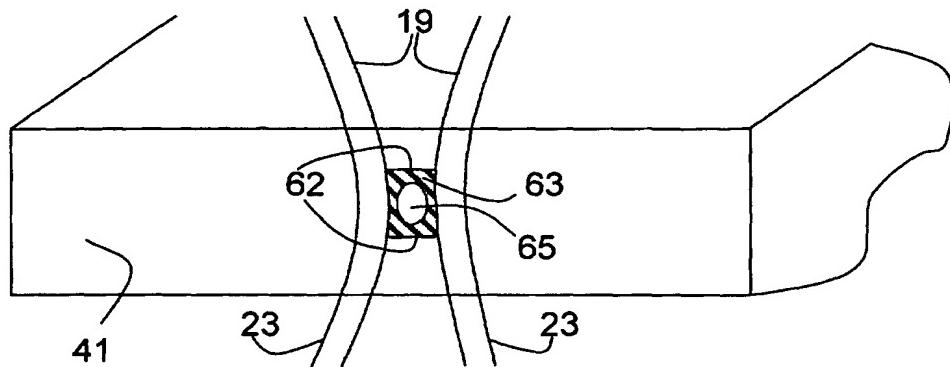
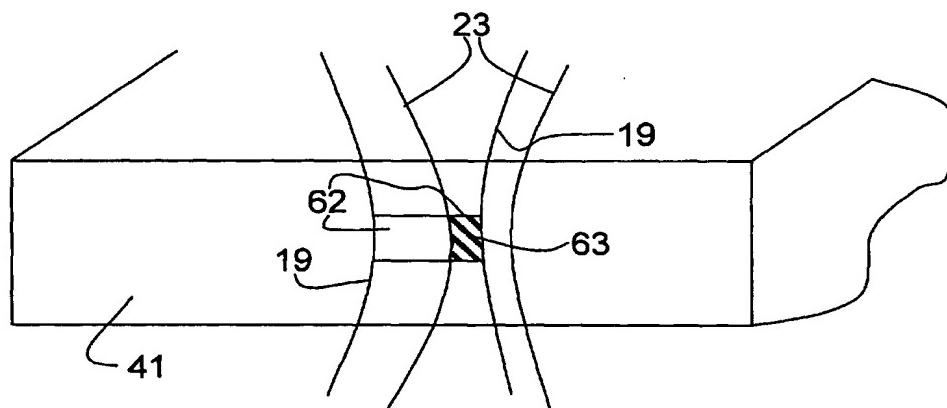


Fig. 3

**Fig. 4a****Fig. 4b**